

Rec'd PCT

11 JAN 2005

PCT/JP 03/08904

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

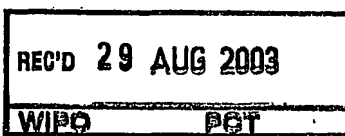
14.07.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 7月12日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-204725
[ST. 10/C]: [JP2002-204725]



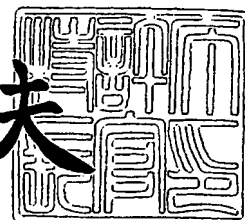
出 願 人
Applicant(s): 科学技術振興事業団
財団法人大阪バイオサイエンス研究所

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 8月14日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



Best Available Copy

出証番号 出証特2003-3065500

【書類名】 特許願

【整理番号】 185029

【提出日】 平成14年 7月12日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 31/00

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市左京区下鴨松原町 4 3 グラン・シティオ
下鴨四季彩館 5 0 3

【氏名】 裏出 良博

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市山田東 4 - 8 - 3 - 3 0 7

【氏名】 江口 直美

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県宝塚市山本南 1 - 3 0 - 7 プリメント昭陽 3 0
1 号

【氏名】 有竹 浩介

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府箕面市小野原東 4 - 1 3 - 1 8 ワイズ参番館 2
0 3

【氏名】 佐藤 陽

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市山田東 4 - 3 7 - 3 8 サンコーポ 3 0 1
号

【氏名】 角山 圭一

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県伊丹市広畑 4 丁目 3 3 番地

【氏名】 谷池 雅子

【特許出願人】

【識別番号】 396020800
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【特許出願人】

【識別番号】 390000745
【住所又は居所】 大阪府吹田市古江台6丁目2番4号
【氏名又は名称】 財団法人大阪バイオサイエンス研究所

【代理人】

【識別番号】 100062144
【弁理士】
【氏名又は名称】 青山 葆

【選任した代理人】

【識別番号】 100086405
【弁理士】
【氏名又は名称】 河宮 治

【選任した代理人】

【識別番号】 100068526
【弁理士】
【氏名又は名称】 田村 恭生

【選任した代理人】

【識別番号】 100098925
【弁理士】
【氏名又は名称】 上田 敏夫

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013262
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9903409

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 脳損傷の予後改善薬とそのスクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 脳損傷の増悪を防止し、予後の改善に用いる薬剤であって、造血器型プロスタグランジンD合成酵素（H-PGDS）阻害剤を有効成分として含む薬剤。

【請求項 2】 H-PGDS阻害剤が 4-ベンズヒドリルオキシ-1-{3-(1H-テトラゾール-5-イル)-プロピル}ピペリジン（HQL-79）である請求項 1 に記載の薬剤。

【請求項 3】 脳損傷の増悪を防止し、予後の改善に用いる薬剤であって、プロスタグランジンD受容体の拮抗薬を有効成分として含む薬剤。

【請求項 4】 1) ヒトH-PGDS大量発現トランスジェニックマウスの脳に外傷を与え、
2) 外傷を与える前又は後に候補化合物をトランスジェニックマウスに投与し、
3) 該マウスにおける外傷の状態を、候補化合物を与えないトランスジェニックマウスにおける状態と比較する、
ことを含む脳損傷の増悪を防止し、予後の改善に用いる化合物のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は、脳損傷の増悪を防ぎ、予後の改善をはかる化合物及びそのスクリーニング方法に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、脳血管障害、脳変性疾患、脱髄疾患等の疾患による脳損傷部位のミクログリア細胞やマクrophageにおいて誘導されるH-PGDSを阻害したり、損傷部位の周辺のアストログリア細胞で発現するプロスタグランジンD受容体の活性化を阻害することにより、プロスタグランジンD2が関与する脳損傷の増悪を防ぎ、予後の改善をはかる化合物と、これらの物質の薬効を、ヒト造血器型プロスタグランジンD合成酵素大量発現トランスジェニックマウスを用いて試験する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

医療技術の発達により、頭部に大規模な損傷を負っても一命を取り留める人が増えている。交通事故や、労働中の災害、スポーツなどにより頭部外傷を負う人は多く、実に交通事故で死亡する人の半数は頭部外傷が原因である。これらは頭蓋骨に外力がかかった際、直下に生じる脳挫傷、あるいは脳浮腫に起因している。脳浮腫とは、脳血管に存在する脳血液関門の破綻が原因であり、血漿成分が血管外に漏出して脳が腫れてくることである。近年この治療法として、低体温法が注目されているが、これは脳代謝を抑えることで脳浮腫の増悪や頭蓋内圧の上昇を抑制し、二次的な脳損傷を防ごうとする治療方法である。重要な治療方針ではあるが、しかし、低体温による心肺機能や免疫機構の低下による問題が生じる場合もある。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は脳の局所的な炎症の遷延による組織損傷を抑止し、予後の改善をはかることのできる新しい化合物を提供することを目的とする。

本発明はまたそのような化合物をスクリーニングする方法を提供することも目的とする

【0004】

【課題を解決するための手段】

上記目的を達成する本発明者は鋭意研究を行ない、次のような知見を得たことに基いて本発明を完成させた。1) 遺伝性であるか外傷性であるかを問わず脳損傷が生じた場合、H-PGDS及びDP受容体の発現が増加する。2) H-PGDSは脳損傷の局所のミクログリア細胞やマクロファージにおいて、DP受容体は損傷部位の周辺のアストログリア細胞で発現が誘導される。3) 損傷部位ではマクロファージの集積、アストログリア細胞の活性化が顕著である。4) H-PGDSの阻害剤又はPD受容体の拮抗剤を投与するとDP受容体の発現が減少し、アストログリア細胞の活性

化が抑制される。5) H-PGDS大量発現トランスジェニックマウスでの損傷が増悪される。

【0005】

即ち、本発明は、脳損傷の増悪を防止し、予後の改善に用いる薬剤であって、H-PGDS阻害剤を有効成分として含む薬剤を要旨とする。

脳損傷には交通事故等による外傷性のものに止まらず、脳梗塞や脳出血等の脳血管障害によるもの、脳変性疾患、脱髄疾患等も含む。

H-PGDS阻害剤の例は、4-ベンズヒドリルオキシ-1-{3-(1H-テトラゾール-5-イル)-プロピル}ピペリジン (HQL-79)、1-アミノ-4-{4-[4-クロロ-6-(2-スルホ-フェニルアミノ)-[1,3,5]トリアジン-2-イルメチル]-3-スルホ-フェニルアミノ}-9,10-ジオキソ-9,10-ジヒドロ-アントラセン-2-スルホン酸 (チバクロンブルー)、1-アミノ-4-(4-スルファモイルアニリノ)-アントラキノ-2-スルホン酸 (PGD-042)、2-(2'-ベンゾチアゾリル)-5-スチリル-3-(4'-フタルヒドラジデイル)テトラゾリウム塩化物 (PGD-016)を含む。

【0006】

本発明はまた、脳損傷の増悪を防止し、予後の改善に用いる薬剤であって、プロスタグランジンD受容体の拮抗薬を有効成分として含む薬剤をも要旨とする。

プロスタグランジンD受容体の拮抗薬の例は、3-ベンジル-5-(6-カルボキシヘキシル)-1-(2-シクロヘキシル-2-ヒドロキシエチルアミノ)-ヒダントイン (BW A868C)、(+)-(3R)-3-(4-フルオロベンゼンスルホンアミド)-1,2,3,4-テトラヒドロカルバゾール-9-プロピオン酸 (ラマトロバン)である。

【0007】

本発明で使用する脳損傷の増悪を防止し、予後の改善に用いる化合物は上記のようにH-PGDS阻害剤又はプロスタグランジンD受容体の拮抗薬から選択することもあるが、次のようにしてスクリーニングすることもできる。

すなわち。

- 1) ヒトH-PGDS大量発現トランスジェニックマウスの脳に外傷を与え、
- 2) 外傷を与える前又は後に候補化合物を該トランスジェニックマウスに投与し

3) 該マウスにおける外傷の状態を、候補化合物を与えないトランスジェニックマウスにおける状態と比較する。

ヒトH-PGDS大量発現トランスジェニックマウスの製造方法は2000年10月5日に出願された国際出願PCT/JP00/06963 (WO 01/24627) に記載されている。その記載は本明細書の一部を構成する。

【0008】

【実施例】

実施例1

遺伝性脱髄疾患における造血器型プロスタグランジンD合成酵素とDP受容体の誘導

Galactosylceramidase欠損症であるヒトKrabbe病のモデルマウスTwitcher (Kobayashi T, et al., Brain Res., 202:479-483, 1980; Duchen LW, et al., Brain, 103:695-710, 1980; Sakai N, et al., J. Neurochem., 66:1118-1124, 1996; Taniike M. et al., J. Neuropathol. Exp. Neurol., 58:644-653, 1999) を用いて、遺伝性の脱髄による脳損傷に伴うH-PGDSとDP受容体のmRNAの変化を、定量的RT-PCR法により定量した (図1参照)。H-PGDSとDP受容体のmRNAの発現量は、共に、脱髄による脳損傷に伴い増加する。

免疫組織染色法により、H-PGDSはミクログリア細胞と脱髄の進んだ組織局所に集積するAmeboid細胞やマクロファージ細胞に発現することを同定した (図2参照)。一方、DP受容体は、脱髄の進んだ組織の周辺に分布する活性化されたアストログリア細胞に発現することを同定した (図3参照)。

【0009】

実施例2

自己免疫性脱髄疾患における造血器型プロスタグランジンD合成酵素とDP受容体の誘導

ヒト多発性硬化症のモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎マウス (Ichikawa M., et al., Cell Immunol., 191:97-104, 1999; Bernhard Hemmer, et al., Nature Review Neuroscience, 3:291-301, 2002) においても、定量的RT-PCR法によ

り測定したH-PGDSとDP受容体のmRNAの発現量は、共に、脱髄による脳損傷と関連した増加を示す（図4参照）。

免疫組織染色法による観察では、H-PGDSはミクログリア細胞と脱髄の進んだ組織局所に集積するAmeboid細胞やマクロファージ細胞に発現する（図5参照）。

【0010】

実施例3

外傷性脳損傷における造血器型プロスタグランジンD合成酵素とDP受容体の誘導
外傷性大脳皮質傷害(Stab wound)モデル (Salhia B, et al., Brain Res., 888: 87-97, 2000; Asahi M., et al., J. Neurosci., 21:7724-7732, 2001; Garcia de Yebenes E., et al., J. Neurochem., 73:812-820, 1999) を用いて、脳損傷におけるH-PGDSとDP受容体のmRNAの発現を調べた結果、H-PGDSは損傷後2日目に最大値を取り（図6参照）、DP受容体は2日目から8日目にかけて持続的に増加した（図7参照）。

損傷の24時間後から傷害部位周囲に集積するミクログリア細胞とマクロファージでH-PGDSの誘導が起こり（図8と図9参照）、傷害部位周辺のアストログリア細胞ではGFAPとDP受容体の発現が増強し、これらの現象は損傷の8日後まで持続した（図10と図11参照）。

【0011】

実施例4

ヒト造血器型プロスタグランジンD合成酵素大量発現による外傷性脳損傷の増悪
ヒトH-PGDS大量発現トランスジェニックマウス (WO 01/24627) を用いたStab woundモデルでは、損傷部位でのマクロファージの集積、および、抗GFAP抗体を用いて免疫組織化学的に調べたアストログリア細胞の活性化が、野生型マウスに比べて顕著であり治癒は遅延した（図12参照）。

【0012】

実施例5

造血器型プロスタグランジンD合成酵素阻害剤投与による遺伝性脱髄疾患におけるアストログリア細胞の活性化の抑制

Twitcherマウスに、H-PGDS阻害剤であるHQL-79（4-ベンズヒドリルオキシ-1

ー{3-(1H-テトラゾール-5-イル)-プロピル}ピペリジン)を30mg/kg/dayの用量で、14日間、皮下投与すると、アストログリア細胞の活性化が抑制され、同時に、アストログリア細胞でのDP受容体の発現が低下した(図13参照)。

【0013】

実施例6

造血器型プロスタグランジンD合成酵素阻害剤投与による外傷性脳損傷におけるDP受容体の誘導の抑制と脳損傷の回復促進

H-PGDS阻害剤であるHQL-79を30mg/kg/dayの用量で、4日間、経口投与すると、Stab woundモデルにおける組織損傷領域でのDP受容体mRNA量は低下し(図14参照)、脳損傷の回復促進が認められた(図15参照)。

【0014】

以上詳述したように、脳血管障害、脳変性疾患、脱髄疾患等の疾患において、脳損傷局所のミクログリア細胞やマクロファージで誘導されるH-PGDSを阻害したり、損傷部位の周辺のアストログリア細胞で発現するDP受容体の活性化を阻害することにより、プロスタグランジンD₂が関与する脳損傷の増悪を防ぎ、予後の改善をはかることが可能となる。さらに、これらの物質の薬効を、ヒトH-PGDS大量発現トランスジェニックマウスを用いて試験することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 Twitcherマウス的大脑と小脳におけるH-PGDSおよびDP受容体mRNAの発現レベルの変化を示す

【図2】 免疫組織染色法によるTwitcherマウスのミクログリア細胞やマクロファージ細胞に局在しているH-PGDSを示す。

【図3】 活性化アストログリア細胞に発現したDP受容体を示す。

【図4】 実験的自己免疫性脳脊髄炎マウスにおけるH-PGDSおよびDP受容体mRNAの発現レベルの変化を示す。

【図5】 実験的自己免疫性脳脊髄炎マウスでのH-PGDS発現レベルの変化を示す。

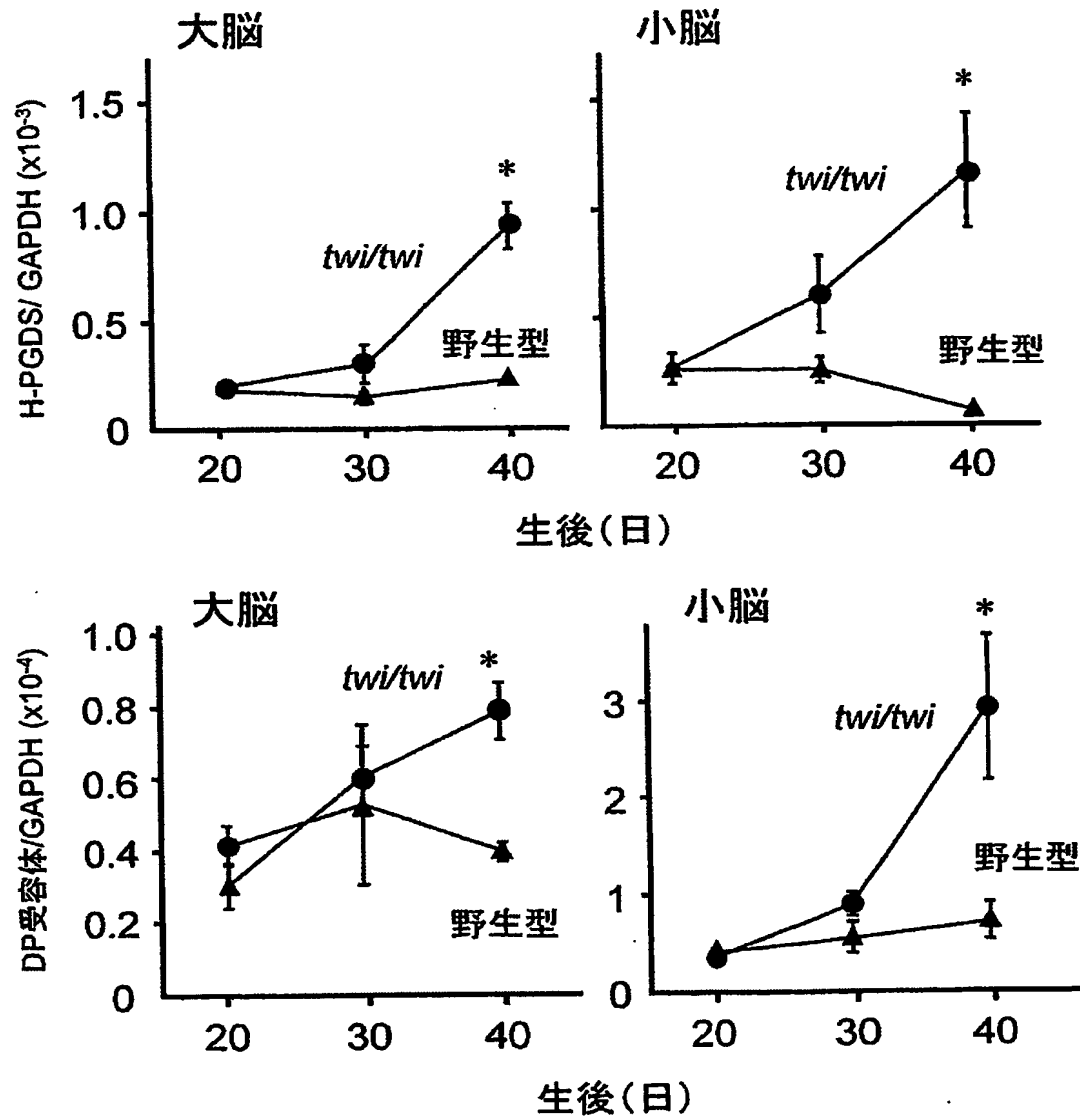
【図6】 外傷性脳損傷モデルでのH-PGDSのmRNA発現量の経時変化を示す。

- 【図 7】 外傷性脳損傷モデルでのDP受容体のmRNA発現量の経時変化を示す。
- 【図 8】 外傷性脳損傷モデルでの炎症の経時変化を示す。
- 【図 9】 外傷性脳損傷モデルにおけるH-PGDS発現の経時変化を示す。
- 【図 10】 外傷性脳損傷モデルにおけるアストログリア細胞の活性化の経時変化を示す。
- 【図 11】 外傷性脳損傷周辺の活性化アストログリア細胞でのDP受容体の発現を示す。
- 【図 12】 外傷性脳損傷から4日後の野生型マウスとヒトH-PGDS大量発現トランスジェニックマウスの脳損傷の比較を示す。
- 【図 13】 TwitcherマウスでのHQL-79によるアストログリア細胞の活性化とDP受容体発現の抑制を示す。
- 【図 14】 外傷性脳損傷後のDP受容体発現に対するHQL-79の抑制効果を示す。
- 【図 15】 外傷性脳損傷に対するHQL-79の回復促進効果を示す。

【書類名】 図面

【図 1】

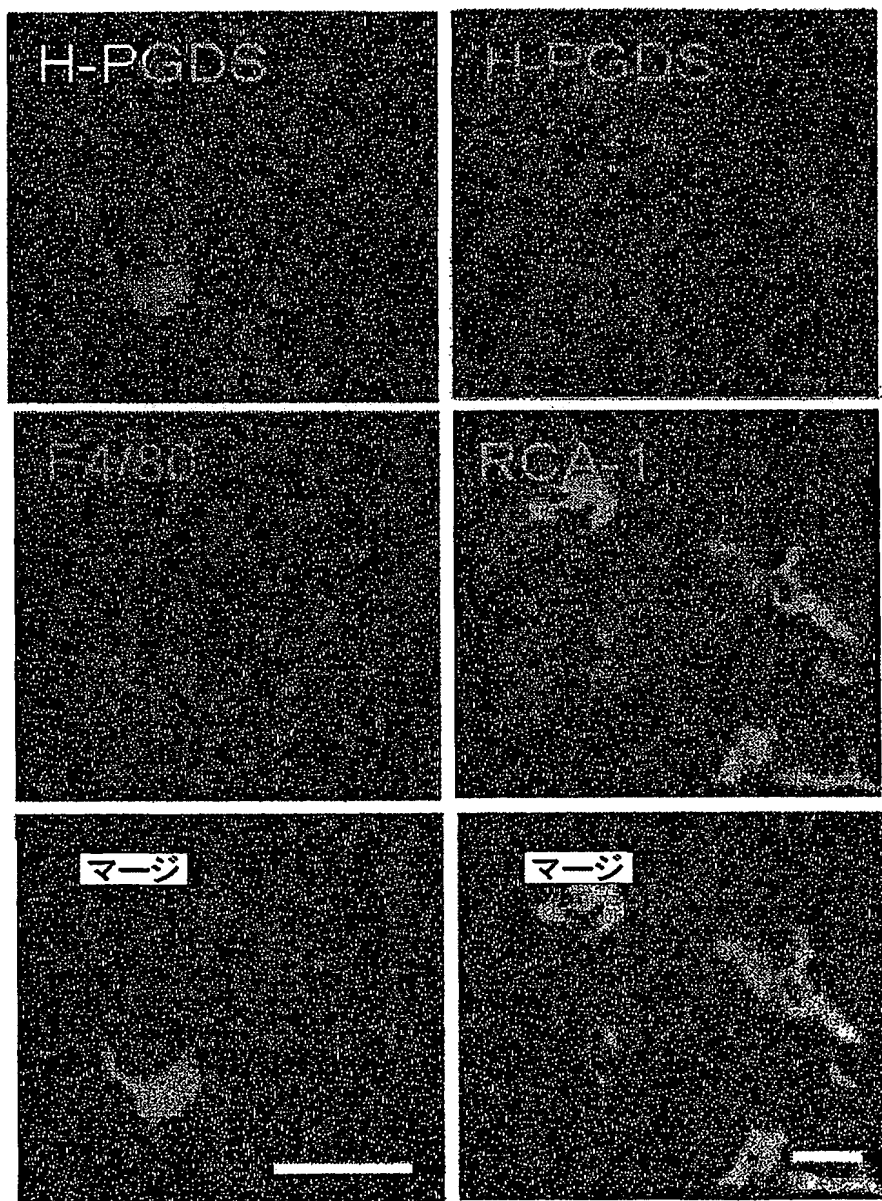
トウィッチャーマウス的大脑と小脳におけるH-PGDS
およびDP受容体mRNAの発現レベルの変化



* : p < 0.05

【図2】

免疫組織染色法によるトウィッチャーマウスのミクログリア細胞やマクロファージ細胞に局在しているH-PGDS

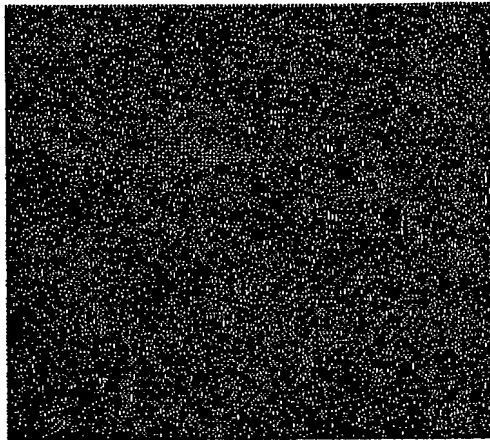


F4/80: ミクログリア細胞特異的抗体による染色
RCA-1: リシナス コミュナス アグルチニン-1 レクチン

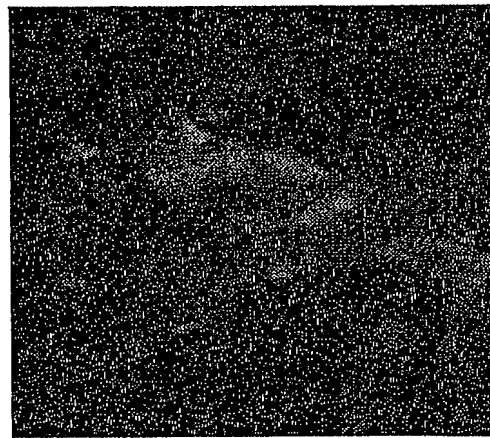
【図 3】

活性化アストログリア細胞に
発現したDP受容体

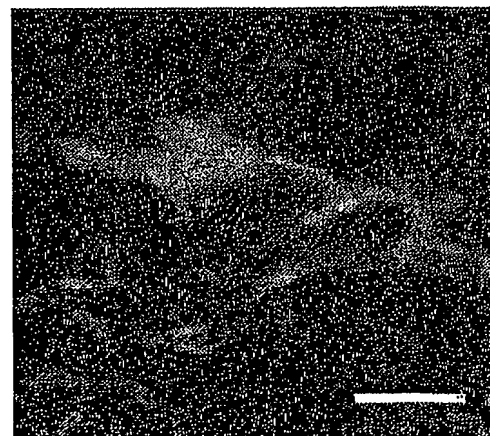
GFAP



DP受容体



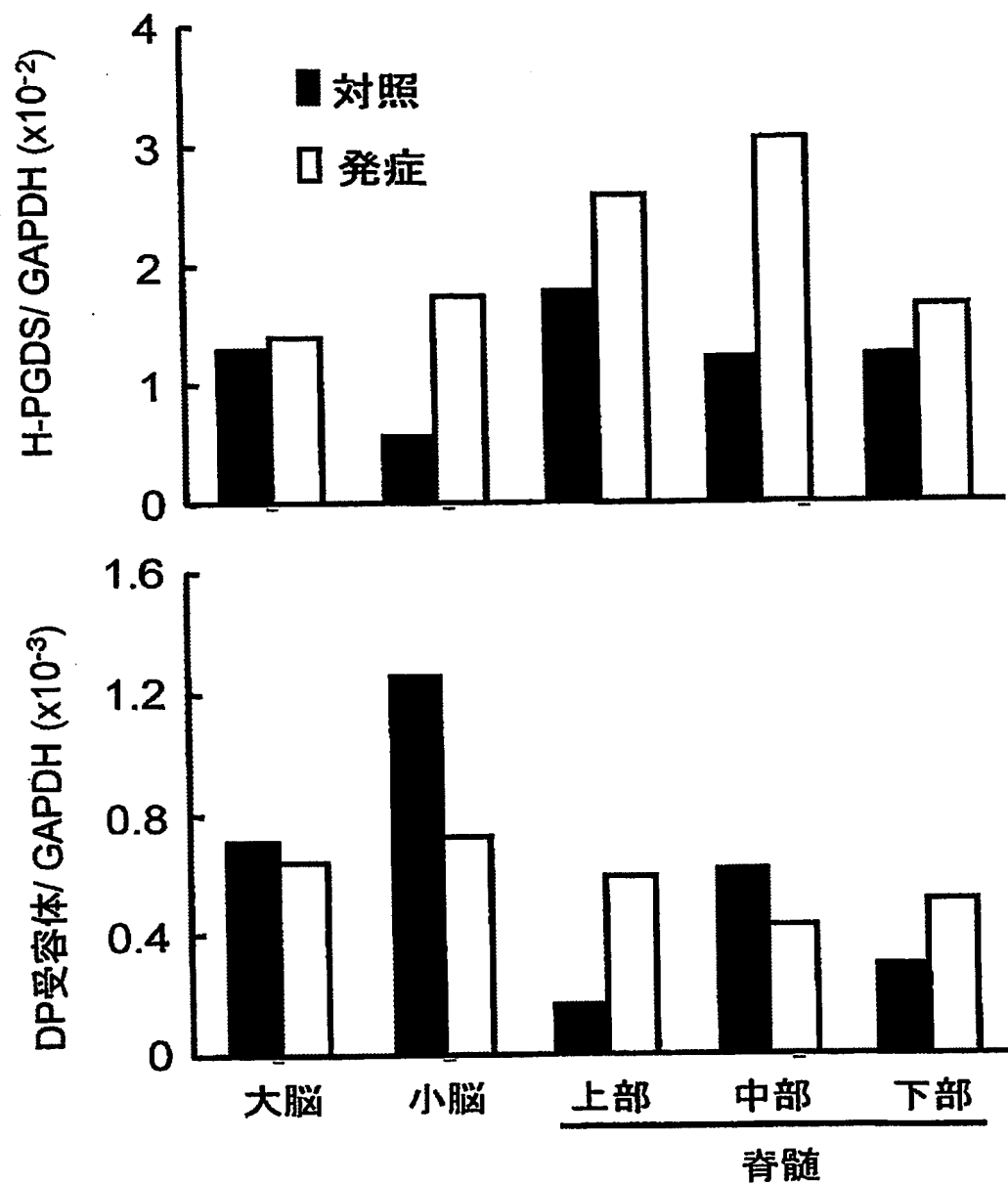
マージ



GFAP:アストログリア特異的抗体による染色

【図4】

実験的自己免疫性脳脊髄炎マウスにおけるH-PGDS
およびDP受容体mRNAの発現レベルの変化



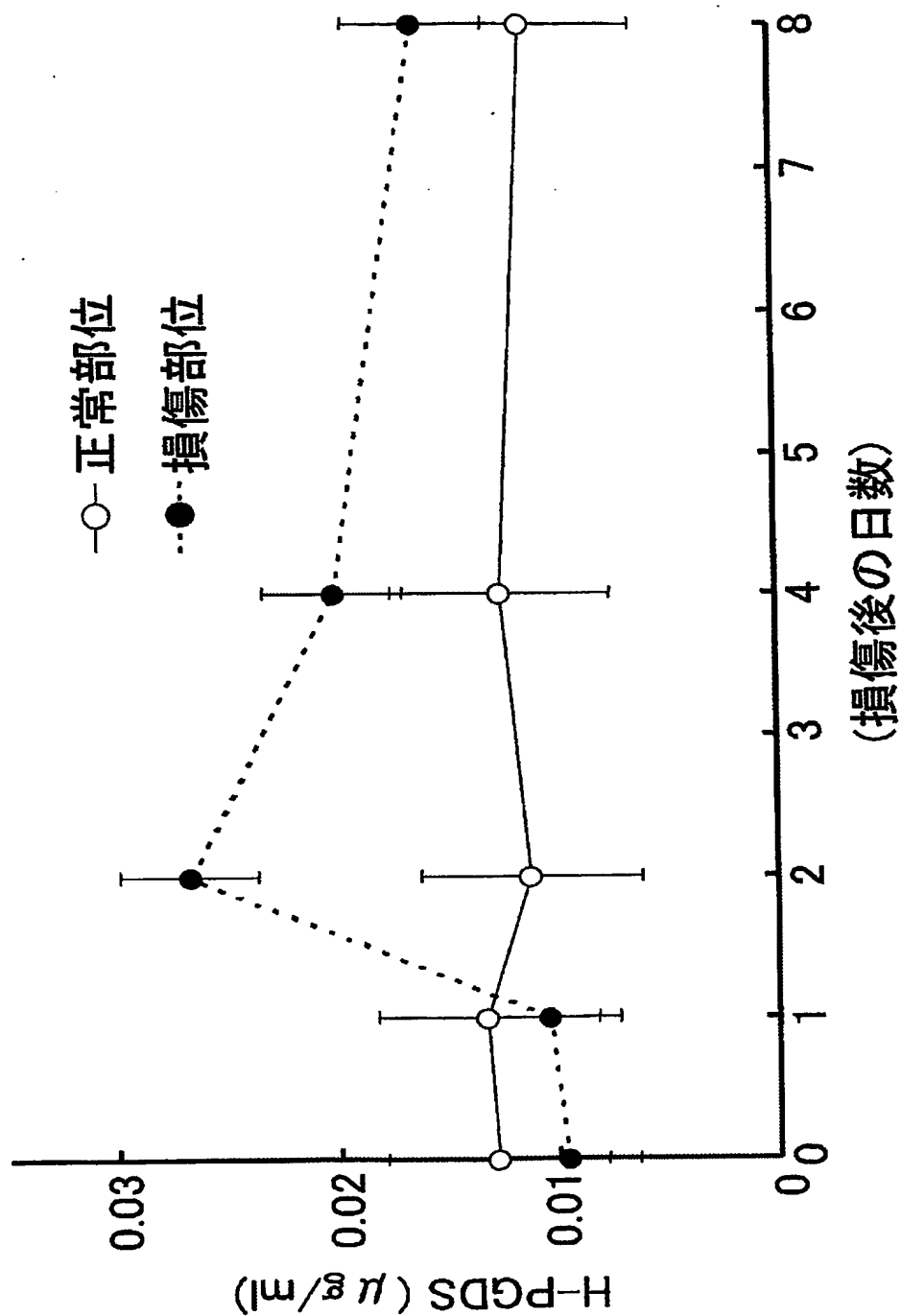
【図 5】

実験的自己免疫性脳脊髄炎マウスでの
H-PGDS発現レベルの変化



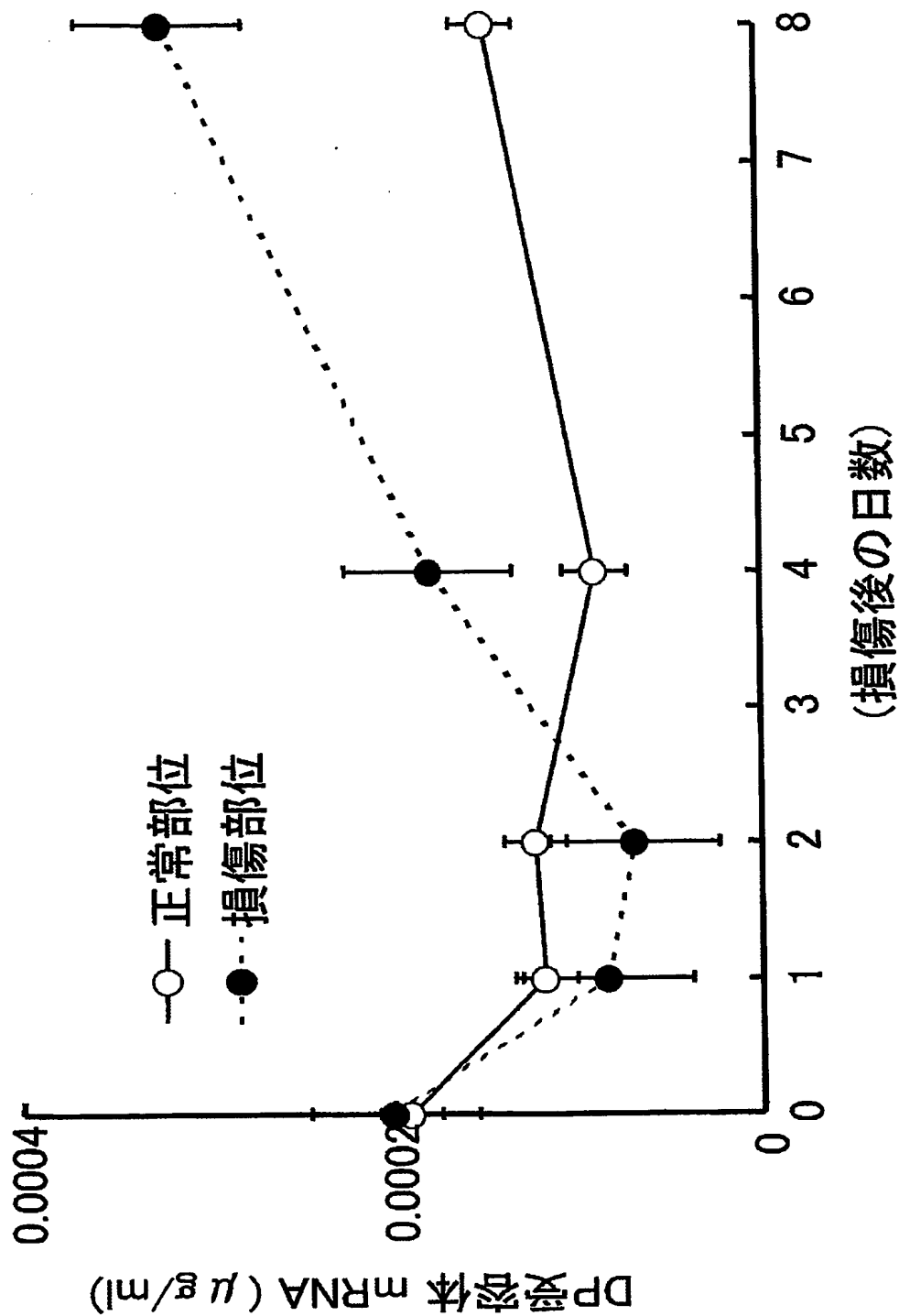
【図 6】

外傷性脳損傷モデルでのH-PGDSのmRNA発現量の経時変化



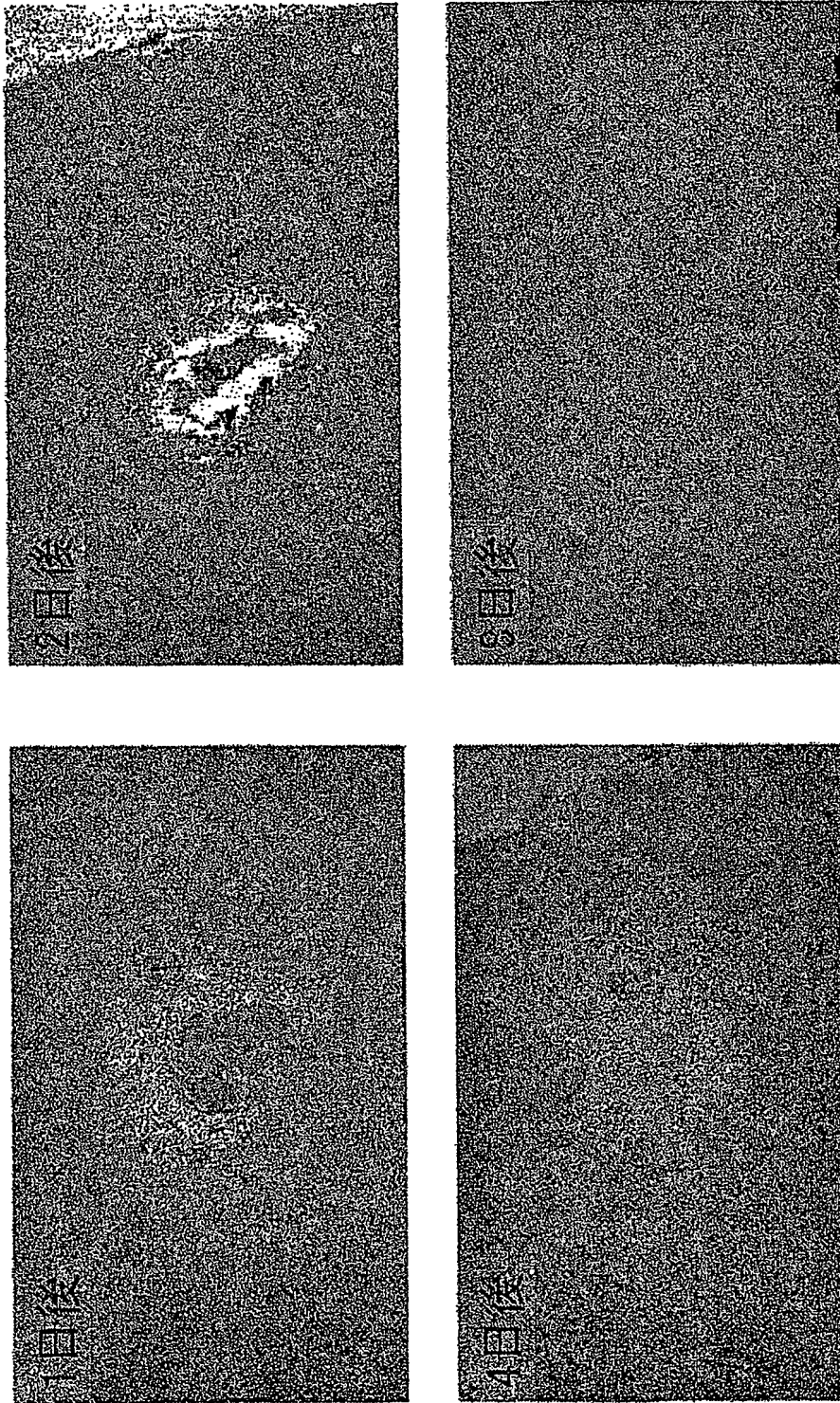
【図 7】

外傷性脳損傷モデルでのDP 受容体のmRNA発現量の経時変化



【図 8】

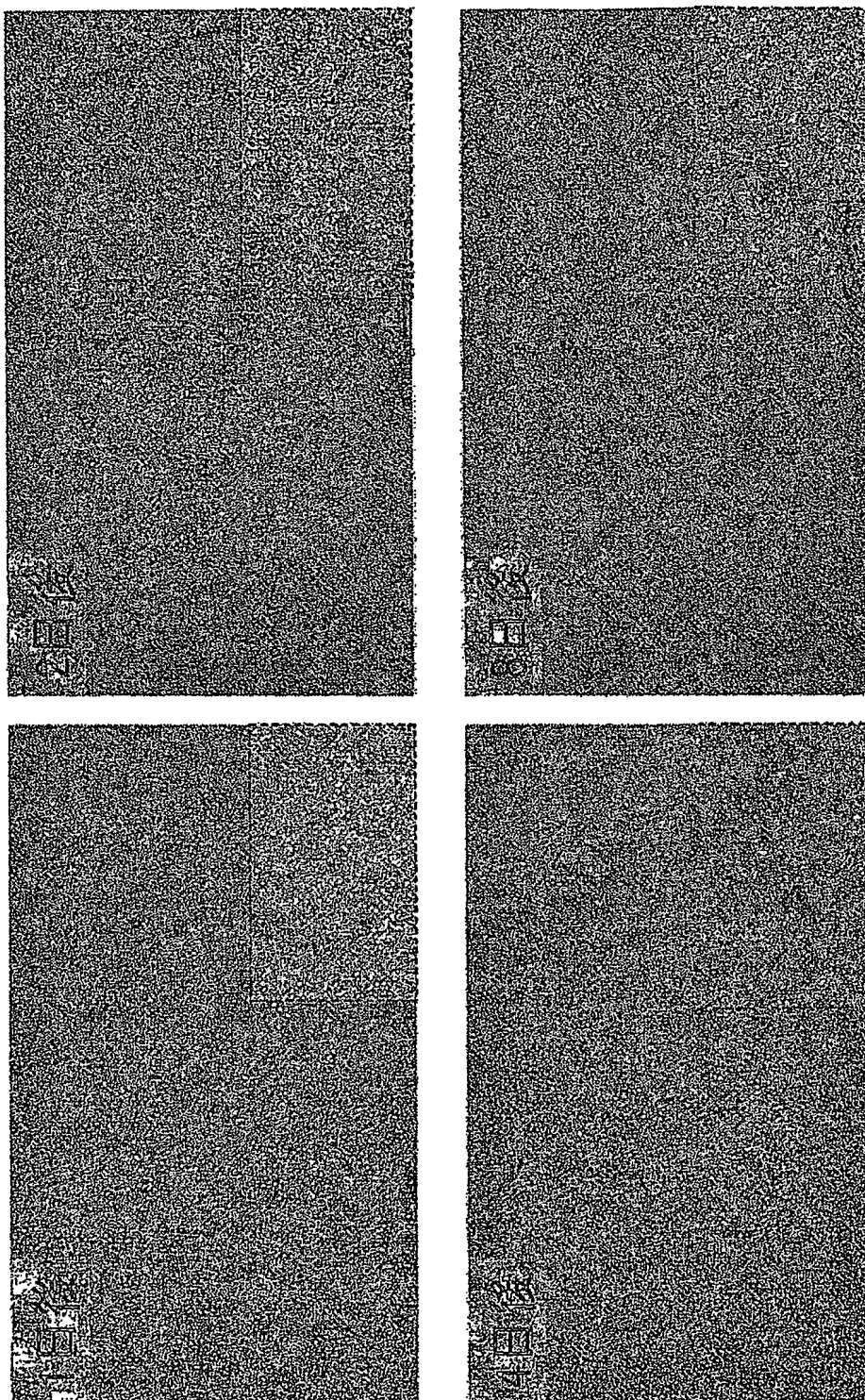
外傷性脳損傷モデルでの炎症の経時変化



(ヘマトキシリン・エオジン染色)

【図 9】

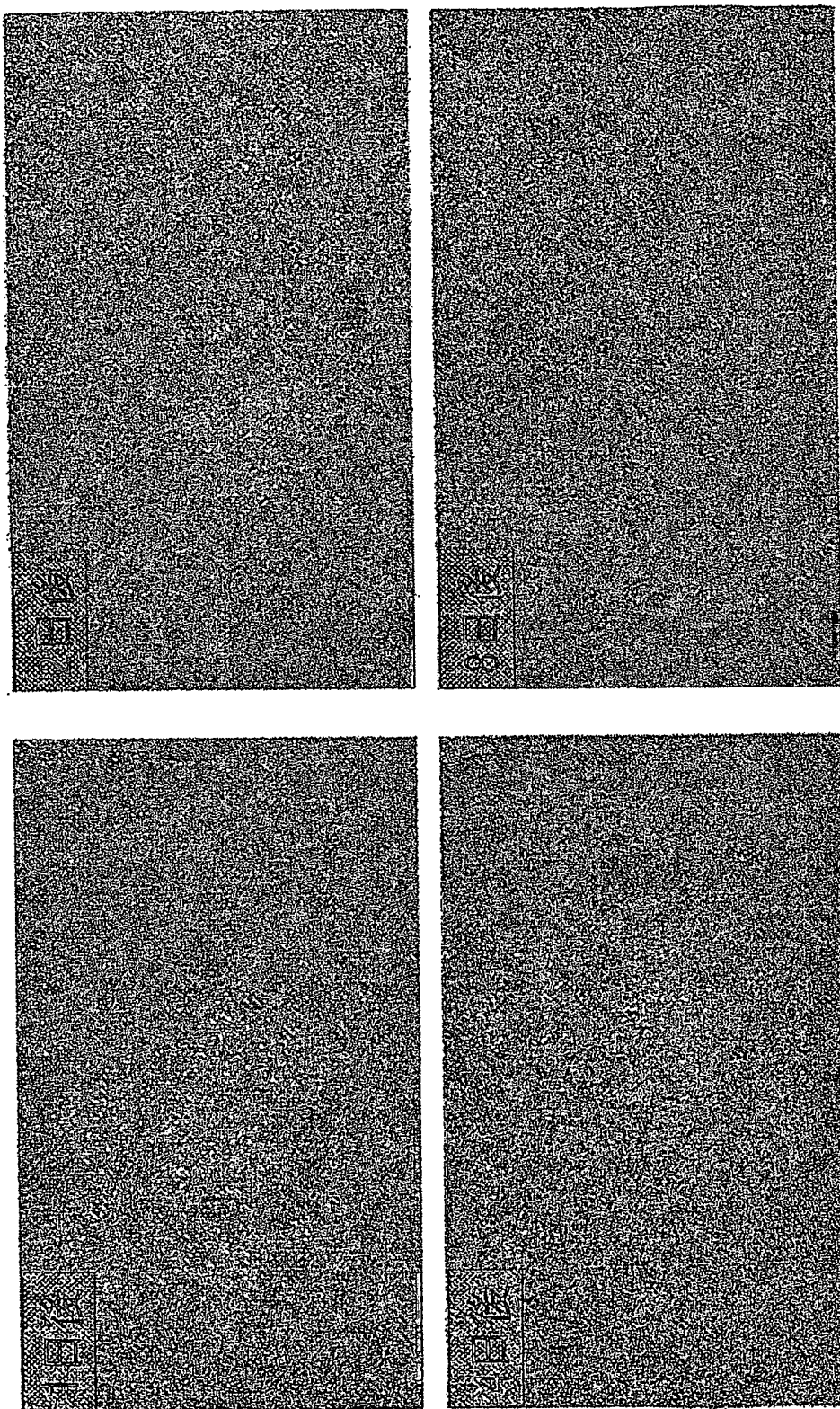
外傷性脳損傷モデルでのH-PGDS発現の経時変化



H-PGDS特異的抗体による染色

【図 10】

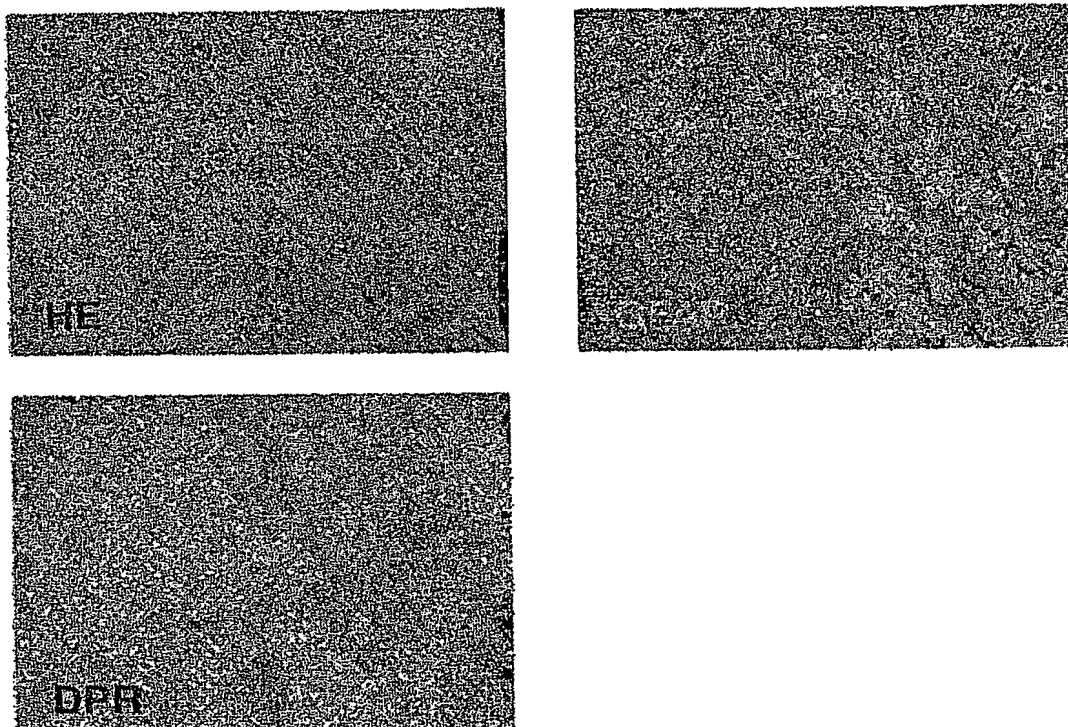
外傷性脳損傷モデルでのアストログリア細胞の活性化の経時変化



GFAP: アストログリア特異的抗体による染色

【図 11】

外傷性脳損傷周辺の活性化アストログリアでの
DP受容体の発現

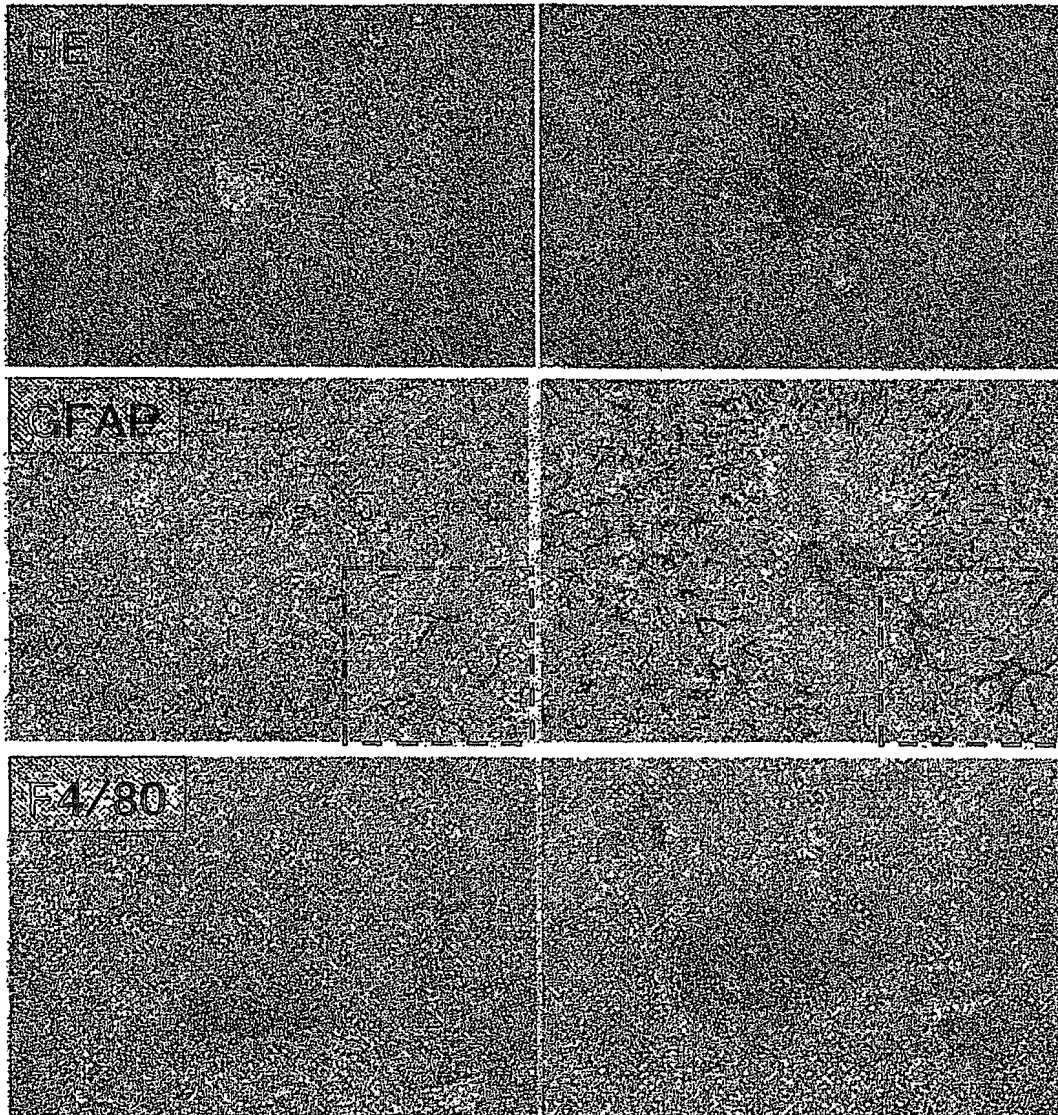


HE : ヘマトキシリン・エオジンによる染色
GFAP: アストログリア特異的抗体による染色
DRP : DP受容体特異的抗体による染色

【図12】

外傷性脳損傷から4日後の脳損傷の比較

野生型マウス

ヒトH-PGDS
トランスジェニックマウス

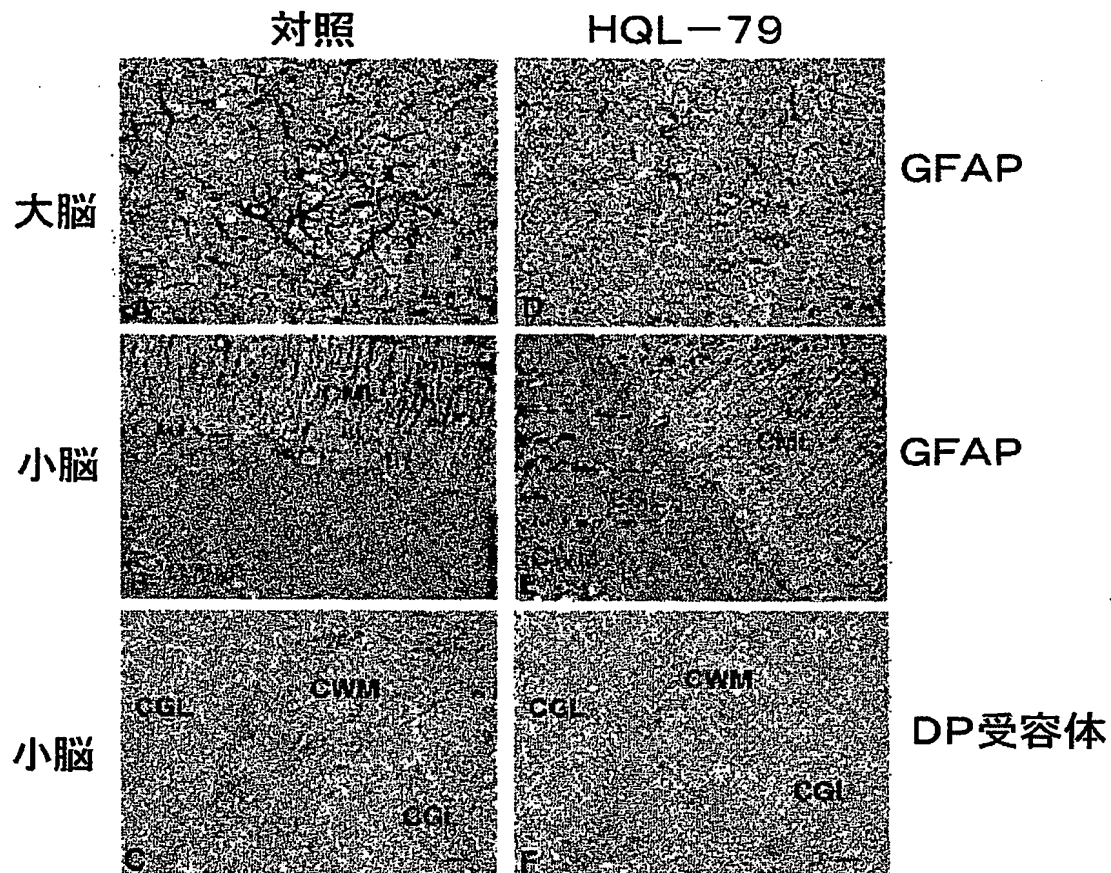
HE : ヘマトキシリン・エオジンによる染色

GFAP: アストログリア特異的抗体による染色

F4/80: ミクログリア細胞特異的抗体による染色

【図13】

トウイッチャーマウスでのHQL-79によるアストログリア細胞の活性化とDP受容体発現の抑制



CML: 小脳分子層

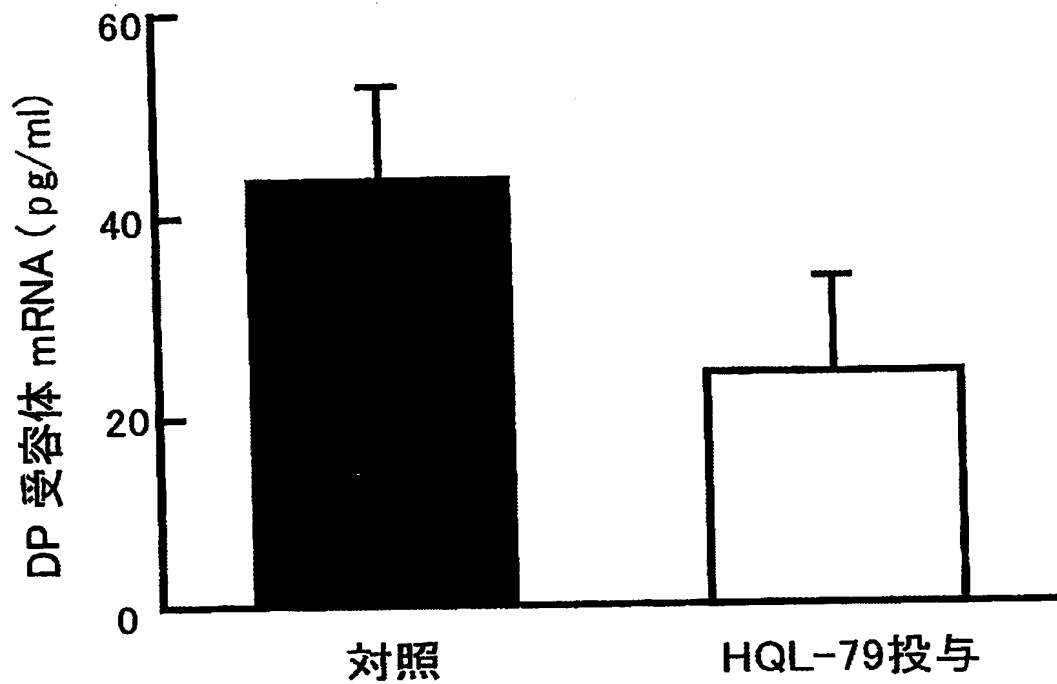
CGL: 小脳顆粒層

CWM: 小脳白質

GFAP: アストログリア特異的抗体による染色

【図 14】

外傷性脳損傷 4 日後の DP 受容体 mRNA 発現に
対する HQL-79 の抑制効果

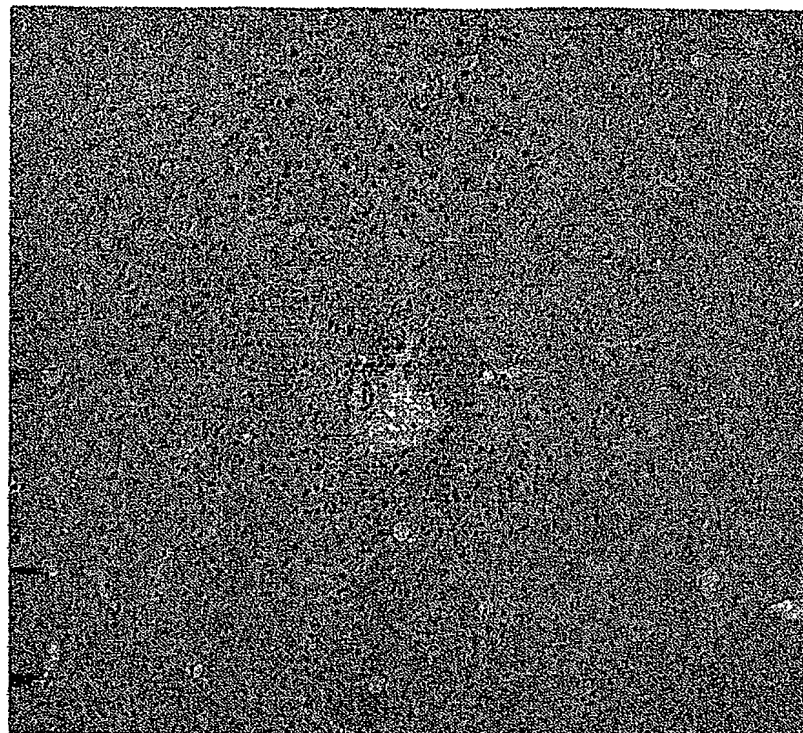
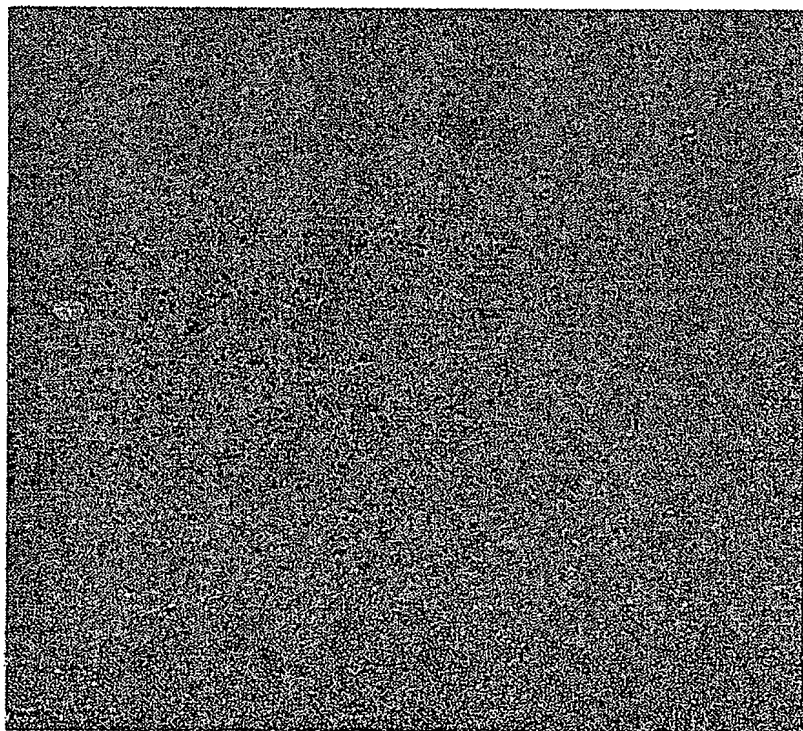


【図 15】

外傷性脳損傷に対するHQL-79の回復促進効果

対照

HQL-79投与群



(ヘマトキシリン・エオジン染色)

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 脳血管障害、脳変性疾患、脱髄疾患等の疾患による脳損傷の増悪を防ぎ、予後の改善をはかる化合物と、そのスクリーニング方法を提供する。

【解決手段】 脳血管障害、脳変性疾患、脱髄疾患等の疾患による脳損傷の局所のミクログリア細胞やマクロファージにおいて誘導される造血器型プロスタグランジンD合成酵素を阻害したり、損傷部位の周辺のアストログリア細胞で発現するプロスタグランジンD受容体の活性化を阻害することにより、プロスタグランジンD2が関与する脳損傷の増悪を防ぎ、予後の改善をはかる。さらに、ヒト造血器型プロスタグランジンD合成酵素大量発現トランスジェニックマウスを用いて、これらの薬効物質を試験する方法。

【選択図】 なし

特願 2002-204725

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団

特願 2002-204725

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[390000745]

1. 変更年月日

1990年 9月21日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府吹田市古江台6丁目2番4号

氏 名

財団法人大阪バイオサイエンス研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.